

氏 名 小倉 謙一

授与した学位 博士

専攻分野の名称 工学

学位授与番号 博甲第3904号

学位授与の日付 平成21年 3月25日

学位授与の要件 自然科学研究科 機能分子化学専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文の題目 Studies of the roles of some active-site amino acid residues in diol dehydratase and adenosylating enzymes

(ジオールデヒドラターゼにおける2,3の活性部位アミノ酸残基の役割と
アデノシル化酵素に関する研究)

論文審査委員 教授 虎谷 哲夫 教授 山田 秀徳 教授 中西 一弘

学位論文内容の要旨

ビタミン B₁₂ は哺乳動物、原核生物をはじめとする様々な生物種にとって重要な栄養因子であり、多くの分野で研究がなされている。アデノシルコバラミンは B₁₂ 補酵素と呼ばれており、生体内ラジカル反応を触媒する補酵素として機能することが知られている。

アデノシルコバラミン関与酵素の触媒反応を解明する上で、アデノシルコバラミンと酵素の結合に関与するアミノ酸残基の機能を解析することは非常に重要である。しかし、これまでアデノシルコバラミン関与酵素において、こうした生化学的な解析がなされた例はない。そこで、本研究ではアデノシルコバラミン関与酵素であり、*Salmonella* 属細菌や *Klebsiella* 属細菌などの原核生物におけるグリセロール代謝の中心的役割を担う酵素であるジオールデヒドラターゼについて、その補酵素と相互作用すると考えられるアミノ酸残基である、Ser α 224 ならびに、Lys β 135 の機能解析を行った。Ser α 224 の機能を解析するために、Sa224A ならびに Sa224N 変異型酵素を作成したところ、Sa224A では酵素反応中に急激な不活性化が起こり、この不活性化が機構依存的なものであることが明らかとなった。Sa224N では、コバルト-炭素 (Co-C) 結合を開裂させる能力がほとんどなくなってしまうと考えられる結果を得た。次に、残基 β 135 の電荷によって酵素の機能がどのように変化するかを調べるために、K β 135R、K β 135A、K β 135Q ならびに K β 135E 変異型酵素を作成した。その結果、残基 β 135 の電荷の違いによって、酵素の補酵素に対する親和性が変化した。リシンと異なり負電荷をもつグルタミン酸置換体 K β 135E の場合、そのアデノシルコバラミンに対する親和性は野生型の 1%以下であった。これらの結果より Ser α 224 は補酵素の Co-C 結合の活性化と触媒反応ならびに不活性化の防止に重要な役割を果たしていることが分かった。また、Lys β 135 は補酵素の結合に関与するが、触媒反応には不可欠でないことが明らかとなった。さらに、ジオールデヒドラターゼの基質結合部位近傍に存在しているアミノ酸残基の機能解析を行った。Asp α 335 は基質に直接配位しているアミノ酸残基である。また、Ser α 333、Arg α 348 は、Asp α 335 と立体的に近接しているアミノ酸残基であり、水素結合ネットワークを構成している。水素結合ネットワークと触媒反応との関連性を調べるために R α 348A、Sa333A、Da335N 変異型酵素を作成し、その比活性を測定したところ、野生型酵素のそれぞれ、10%、31%、0.018%であった。これより Asp α 335 は触媒反応に必須なアミノ酸残基であるが、Ser α 333、Arg α 348 はそれほどではなく、直接プロトンの受け渡しに寄与していないことが示唆された。

また、アデノシルコバラミンがジオールデヒドラターゼに結合し、グリセロールを基質として触媒反応を行った際には不活性化が起こることが知られている。この不活性化はアデノシルコバラミンが修飾を受けることと密接に関連しており、機構依存的な不活性化の一種である。修飾を受けた不活性化型コバラミンは、アデノシルコバラミンと交換することが知られている。酵素から引き離された不活性化型コバラミンはその後再アデノシル化を受けると考えられるので、その反応を触媒する酵素として *Klebsiella oxytoca* の3種のアデノシルトランスフェラーゼ *pduO*、*eutT*、*cobA* の探索と遺伝子クローニングを行った。高発現させ、酵素を精製して調べた結果、*pduO*、*eutT*、*cobA* いずれのタイプのアデノシルトランスフェラーゼにも酵素活性を確認できた。

論文審査結果の要旨

ビタミン B₁₂ の補酵素型であるアデノシルコバラミン (AdoCbl) は生体内ラジカル反応のための補酵素として働く。AdoCbl はアポ酵素に結合してそのコバルト-炭素 (Co-C) 結合が開裂し、生じるラジカル種が酵素反応に関わるので、酵素と補酵素との結合に関与するアミノ酸残基の機能を解析することは触媒機構を解明する上で非常に重要である。本研究では、細菌のジオールやグリセロールの代謝において中心的役割を担うジオールデヒドラターゼについて、補酵素と相互作用している Ser α 224 および Lys β 135 の変異型酵素を作成し機能解析を行っている。S α 224A では酵素反応中に速やかな機構依存的な不活性化が起こり、S α 224N では Co-C 結合を開裂させる能力がほとんど失われていた。したがって、Ser α 224 はアデニン環 N3 との水素結合を形成することで、補酵素の Co-C 結合の活性化と触媒反応ならびに不活性化の防止に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、K β 135E の AdoCbl に対する親和性は野生型の 1% 以下に低下した。K β 135A、K β 135Q の補酵素に対する親和性も野生型より有意に低下したが、野生型の 50% 以上の触媒活性を示した。よって、Lys β 135 は補酵素の結合に関与するが、触媒反応には不可欠でないことが示された。さらに、基質と水素結合している Asp α 335 が Ser α 333、Arg α 348 と水素結合ネットワークを構成していることに着目し、D α 335N、R α 348A、S α 333A を作成したところ、比活性は野生型酵素のそれぞれ 0.018%、10%、31% であった。したがって、Asp α 335 は触媒に必須の残基であるが、Ser α 333、Arg α 348 との水素結合ネットワークは反応に直接関与していないことが示された。

ジオールデヒドラターゼは基質によっては速やかな機構依存的な不活性を受けるが、この過程で損傷を受けた補酵素は再活性化因子により AdoCbl と交換されて酵素が再活性化される。解離した損傷補酵素は再アデノシル化を受けて修復される。本研究では、*Klebsiella oxytoca* の 3 種のアデノシル化酵素の遺伝子クローン化、高発現を行い、精製した PduO、EutT、CobA 蛋白質がいずれも機能を有することを確認した。

以上のように本研究では、ビタミン B₁₂ 補酵素関与酵素の 2,3 の活性部位アミノ酸残基の役割とアデノシル化酵素に関して、重要かつ独創的な新発見が得られている。よって、本論文は博士 (工学) の学位に値するものと認める。